叶面喷施钙镁肥对‘妃子笑’荔枝果肉苹果酸积累的影响

廖海枝，林晓凯，杨成坤，杜婧加，彭俊杰，周开兵*

（海南大学 园艺学院 热带作物新品种选育教育部工程研究中心 海口 570228）

摘要：探讨叶面喷施钙镁肥对‘妃子笑’荔枝果肉苹果酸积累的影响，为我国荔枝实际生产提供一定的理论参考和技术支持。该文对‘妃子笑’荔枝树冠作喷布 0.3%氯化钙（Ca）、0.3%氯化镁（Mg）及其二者混合（Ca+Mg）等水溶液处理，以树冠喷布清水为对照（CK），测定不同生长时期果肉水溶性钙和镁、苹果酸等含量及苹果酸代谢相关酶活性的动态变化，并作多元线性相关分析。结果表明：（1）苹果酸含量呈“L”型变化，Mg、Ca 和 Ca+Mg 处理在果实发育前期促进苹果酸积累，Ca 处理在后期促进苹果酸积累；（2）果肉水溶性钙含量总体呈上升趋势，水溶性镁含量大致呈“M”的动态变化趋势；（3）CK 和 Ca 处理的苹果酸含量与 NADP-ME 活性、Ca+Mg 处理的苹果酸含量与 PEPC 和 NAD-MDH 活性等均呈正相关，CK 的苹果酸含量与 PEPC 活性、MS 活性呈负相关；（4）水溶性钙抑制 NAD-MDH、NADP-ME 等活性，水溶性镁抑制 NAD-MDH、MS 等活性。综上可知，钙、镁叶面营养通过改变水溶性钙、镁等含量和苹果酸代谢途径不同关键酶活性而影响果肉苹果酸积累，其中 Ca 处理可能通过积累更多的苹果酸而抑制果肉呼吸作用，进而使果肉减少糖分损失，在生产中可作施肥技术应用。

关键词: ‘妃子笑’荔枝，叶面喷肥，水溶性钙，水溶性镁，苹果酸

中图分类号：Q945.15 **文献标识码：**A

Effects of foliar calcium and magnesium fertilizer on malic acid accumulation of ‘Feizixiao’litchi fruit

LIAO Haizhi, LIN Xiaokai, YANG Chengkun, DU Jingjia, PENG Junjie, ZHOU Kaibing*

(*Engineering Research Center for Breeding of New Varieties of Tropical Crops, Ministry of Education, College of Horticulture, Hainan University*, Haikou 570228, China)

Abstract: Spraying the foliar nutrition of calcium and magnesium on ‘Feizixiao’ litchi was explored for the effect of malic acid accumulation to provide some theoretical reference and technical support for the actual production of litchi in China. During the period of ‘Feizixiao’ litchi fruit development, 0.3% magnesium chloride (Mg), 0.3% calcium chloride (Ca), their mixture (Ca+Mg) and clean water (CK) were sprayed on leaves. And contents of water-soluble calcium, water-soluble magnesium and malic acid and the activities of malic acid metabolism-related enzymes in fruit flesh were measured. The multivariate linear correlation analysis were also performed. The results were as follows: (1) The content of malic acid showed a L-shaped trend, Mg, Ca and Ca+Mg treatments might promote the accumulation of malic acid in the early stage of fruit growth and development, while Ca treatment might promote the accumulation of malic acid in the late stage. (2) The content of water-soluble calcium in the flesh showes increasing trend, and the content of water-soluble magnesium showes the trend like “M”.

基金项目: 国家自然科学基金（31960570）；海南大学世界一流学科建设经费专项资助（RZZX201906）[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31960570); World First-Class Discipline Construction Fund of Hainan University (RZZX201906)]。

作者简介: 廖海枝（1997-），硕士研究生，主要从事果树生理与栽培研究，（E-mail）2362746801@qq.com。

***通信作者：**周开兵，博士，教授，主要从事果树生理与栽培研究，（E-mail）zkb@hainanu.edu.cn。

(3) The content of malic acid was positively correlated with the activity of NADP-ME in CK and Ca, and PEPC and NAD-MDH in Ca+Mg, while the content of malic acid was negatively correlated with the activity of PEPC and MS in CK. (4) The water-soluble calcium inhibited the activities of NAD-MDH and NADP-ME, while water-soluble magnesium inhibited the activities of NADP-MDH and MS. In conclusion, foliar spraying of calcium and magnesium can affect the contents of water-soluble calcium, magnesium and malic acid metabolism-related enzymes, and the linear correlation also changes. Different treatments can affect the accumulation of malic acid in pulp and cause the change of total acid content in pulp. Ca treatment may inhibit pulp respiration by accumulation of malic acid and then reducing the loss of sugar in pulp, which can be used as fertilizer technology in production.

Key words: ‘Feizixiao’ litchi, foliage spray, water-soluble calcium, water-soluble magnesium, malic acid

‘妃子笑’荔枝（*Litchi chinensis* Sonn. cv. Feizixiao）是我国荔枝主栽品种之一，是海南产区栽培面积最大的品种，具有较高的经济和社会效益（陈业光等，2008）。有机酸组分与含量是‘妃子笑’荔枝果实品质风味的重要组成因素（朱慧芹，2013）。‘妃子笑’荔枝果实的主要有机酸为苹果酸（胡志群等，2005），为苹果酸型果实（周先艳等，2015），因此苹果酸含量是影响‘妃子笑’荔枝果实品质的重要影响因子。苹果酸是一种重要的初级代谢产物，在调节苹果渗透压、pH 稳态、抗逆性和果实品质等方面发挥着关键作用（Zhang et al., 2020）。苹果酸作为‘妃子笑’荔枝果实的主要有机酸，对总酸含量有着很重要的影响（乔方等，2012）。因此，研究荔枝苹果酸的积累特性，对丰富荔枝果实发育理论具有重要意义。

近年来，国内外学者对果实有机酸代谢及其生理机制问题进行了研究，如糖酵解反应、三羧酸循环、糖异生作用等途径均存在着有机酸的踪迹（周先艳等，2015）。植物果实有机酸代谢过程极其复杂，其中，有机酸代谢相关酶与有机酸含量密切相关（郭润姿等，2013）。苹果酸为植物果实重要有机酸之一，研究其代谢尤为重要，目前在不同植物有机酸代谢中，除烯醇式磷酸丙酮酸羧化酶（PEPC）均为关键酶外（Berüter, 2004），在不同植物上曾报道过苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）（Maldonado et al., 2004）、苹果酸酶（NADP-ME）（Crecelius et al., 2003）、苹果酸合成酶（MS）（Surendranathan & Nair, 1976）等分别为其果实苹果酸代谢途径的相关酶。温清玉等人报道，在荔枝中，PEPC 是苹果酸合成的关键酶，NAD-MDH 和 NADP-ME 也会影响苹果酸含量，但因品种不同而存在差异（温清玉，2012）。此外，在不同果实上也存在相似情况。在‘蜂糖李’果实发育前期，苹果酸含量的变化由 PEPC 和 NADP-ME 协同调控，NAD-MDH 作用不大；而与之不同的是，‘四月李’果实中引起苹果酸含量变化的关键酶是 NAD-MDH 与 NADP-ME（王小红等，2018）。郭润姿等（2013）报道，苹果酸脱氢酶和苹果酸酶在黄冠梨果实发育中对苹果酸的产生与降解有重要作用。除此外，温度、养分、品种遗传性等也会引起果实糖酸风味的变化（张红，2009）。前人报道，营养元素会对果实品质存在较大影响，比如硒可以提高香蕉的果实品质（刘洁云等）。营养元素也会对果实酸度有较大影响，氮、鳞、钾、铜、铁等营养元素会影响果实酸度（陈发兴等，2005）。可见，苹果酸代谢仍处于探索阶段，因此，研究苹果酸代谢机制及如何调节苹果酸积累进而调节总酸含量是‘妃子笑’荔枝产业健康发展亟需解决的科学问题。

本课题组前期研究发现施肥技术会影响矿质营养代谢而影响果实品质（苏阳等，2015b），此外，还筛选出了能缓解‘妃子笑’荔枝果肉“退糖”现象（果面全红时果肉含糖量发生下降的现象）（苏阳等，2015a）的钙镁肥处理，其机制除了要关注果肉糖代谢变化问题外，果肉有机酸代谢是否发生变化的问题也不能忽视。鉴于此，本研究通过对‘妃子笑’荔枝树冠进行叶面喷施钙、镁肥处理，观测不同生长时期果肉水溶性钙和镁、苹果酸等含量及苹果

酸代谢相关酶活性的动态变化，比较不同处理和对照间的差异，探讨叶面喷施钙、镁肥对果肉苹果酸积累的影响，以期探索调控果实酸含量的栽培措施提供理论依据，进而有效调控荔枝果实风味品质。

1 材料与方法

1.1 材料和试验设计方法

荔枝果实采摘于海南省临高县金牌农场五队荔枝园。选取营养状况良好、生长状况相近、无病虫害、株、行距 6 m×7 m，冠幅约 3 m×4 m 的 16 年生‘妃子笑’荔枝果树 20 株。试验期间对 20 株果树采取一致的肥水管控、防病虫害管理措施。

设置以下处理：（1）树冠叶面喷布 0.3%氯化钙水溶液（Ca 处理）；（2）树冠叶面喷布 0.3%氯化镁水溶液（Mg 处理）；（3）树冠叶面喷布 0.3%氯化钙和 0.3%氯化镁混合水溶液（Ca+Mg 处理）；（4）喷清水为对照（CK）。单株区组，重复 5 次。在每株样树的树冠中部外围四方选 5 个大小基本一致且生长中庸的果实进行挂牌标记，试验期间以这 5 个果的平均纵、横径为标准，在树冠中部外围选取对应大小的果实作为样果。每次处理前先取好果样 30 个，处理时间为谢花后 35、42、50 d（上午 9—10 时），共处理三次，此后分别继续于谢花期后 56、63、69、73 d 取果样，共取样 7 次，果样就地放入液氮罐速冻，并储存于-80 ℃超低温冰箱中备用。

1.2 方法

苹果酸含量测定：参考胡志群等（2005）与王芮东等（2016）的测定方法并略有改动，将流动相换为 0.1%磷酸二氢钠溶液，用磷酸调 pH 至 2.8。

苹果酸代谢途径相关酶活性测定：采用 Hirai & Ueno（1977）和罗安才等（2003）的方法制备酶液和测定酶活性。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度（OD 值），通过标准曲线计算样品中烯醇式磷酸丙酮酸羧化酶（PEPC）、苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）、苹果酸酶（NADP-ME）、苹果酸合成酶（MS）的酶活性。

水溶性钙、镁含量测定：称取 1 g 左右荔枝果肉，连续烘干至恒重后加水研磨至匀浆，再用去离子水震荡过夜后待测。采用火焰原子吸收法测定水溶性钙、水溶性镁含量（殷丽等，2013），使用仪器为 NOVAA400P 原子吸收分光光度计。

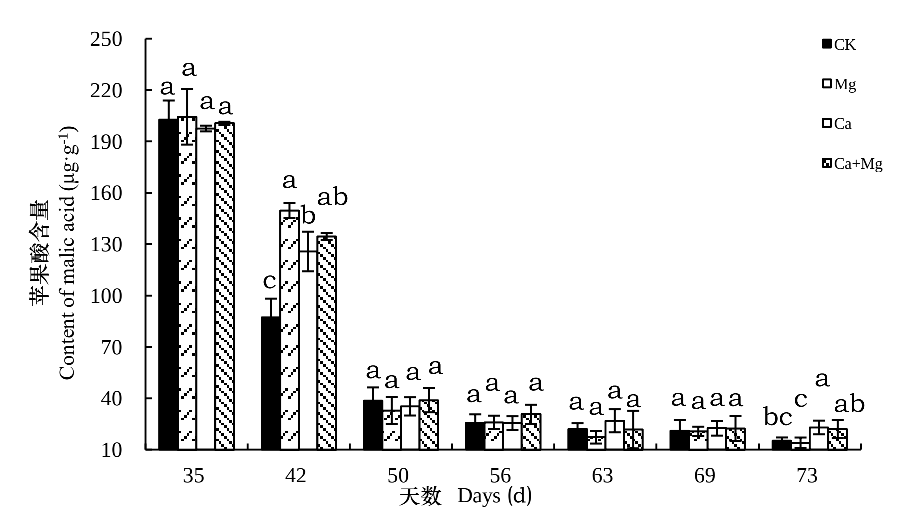
1.3 数据分析

采用 SAS 软件统计分析数据，采用 ANOVA 过程作方差分析和 DUNCAN 法作多重比较分析，采用 REG 过程作多元线性相关性分析。

2 结果与分析

2.1 苹果酸含量变化

如图 1 所示，在‘妃子笑’荔枝果实发育过程中，所有处理的苹果酸含量的变化趋势均呈现“L”型，花后 50 d 前急剧下降，后期趋于稳定。在花后 42 d，CK 显著低于其余三个处理，而 Mg 处理又显著高于 Ca 处理；在花后 50 d 至 69 d，所有处理间均无差异显著性；在花后 73 d，Ca 处理显著高于 CK 和 Mg 处理。综上所述，Ca、Mg 和 Ca+Mg 处理只影响了前期苹果酸的积累，且存在促进作用，后期则仅 Ca 处理呈促进趋势。



同一时间不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05）。下同。

Different lowercase letters for the same time represent significant differences (*P*<0.05). The same below.

图 1 不同处理下的苹果酸含量变化

Fig. 1 Contents changes of malic acid in different treatments

2.2 苹果酸代谢途径相关酶活性变化

2.2.1 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC）

如图 2 所示，CK 的 PEPC 酶活性随果实发育进程历经三次“上升、下降”交替过程。Mg 处理在 35 d 至 42 d 呈“平缓、上升”趋势，随后与 CK 趋势趋于一致；Ca 处理则表现为“下降、上升、平缓、下降”的趋势；Ca+Mg 处理呈“上升、下降、平缓、下降、上升、下降”的趋势。在花后 42 d，CK 显著高于其余三个处理，Ca+Mg 处理又显著高于 Mg 和 Ca 处理；在花后 50 d，Ca 处理显著最高；在花后 56 d，Mg 和 Ca 处理显著高于 CK 和 Ca+Mg 处理，CK 又显著高于 Ca+Mg 处理；在花后 63 d，Ca 处理显著最高，CK 又显著高于 Mg 和 Ca+Mg 处理；在花后 69 d，CK 显著高于 Ca+Mg 处理；在花后 73 d，CK 和 Ca 处理显著高于 Mg 和 Ca+Mg 处理。由此可知，Ca 处理在花后 50 d 之后呈高于 CK 和其余处理趋势，Ca+Mg 处理全程低于 CK，Mg 处理后期也具有低于 CK 的趋势，可见，Ca 处理呈提高 PEPC 活性的趋势，而 Mg 和 Ca+Mg 处理呈抑制 PEPC 活性的趋势。

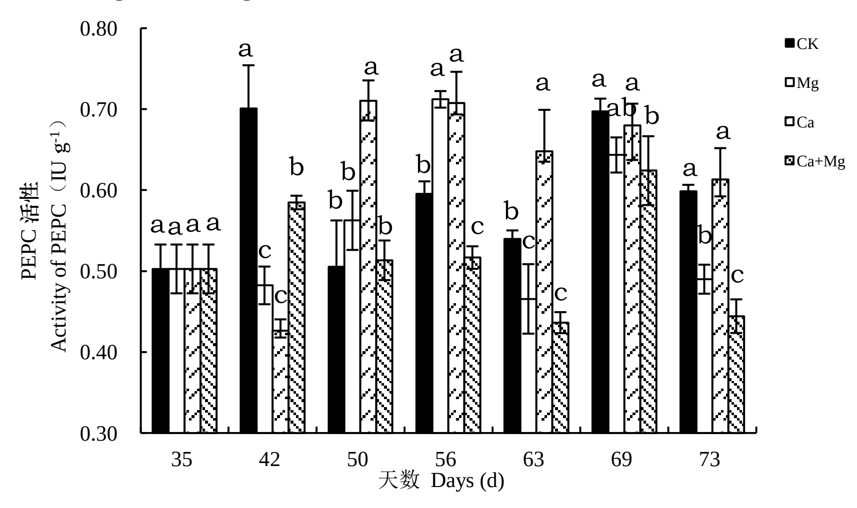


图 2 不同处理下的 PEPC 活性动态变化

Fig. 2 Dynamic changes of PEPC activities under different treatments

2.2.2 NAD-苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）

如图 3 所示，不同处理和 CK 的果肉 NAD-MDH 活性具有不同的动态变化趋势。CK 呈“上升、平缓、下降、上升”趋势；Mg 处理呈“下降、上升、平缓、上升、下降”趋势；Ca 处理先无明显变化，随后历经两次“下降、上升”交替过程；Ca+Mg 处理呈两次“下降、上升”交替趋势。由图 3 还可知，在花后 42 d，CK 和 Ca 处理显著高于 Mg 和 Ca+Mg 处理；在花后 50 d 至 56 d，CK 均显著最高，Mg 处理又显著高于 Ca+Mg 处理，其中在 50 d 时为 Mg 处理显著高于 Ca 处理，在 56 d 则为 Mg 处理显著低于 Ca 处理；在花后 63 d，Mg 处理显著高于 Ca 处理；在 69 d，Mg 处理显著高于 CK 和其余处理；在花后 73 d，Mg 处理显著低于 CK 和其余处理，其余处理与 CK 无显著差异。由此可知，在 63 d 前，CK 持续高于其余处理，在 63 d 后，Mg 处理与 CK 趋势相反，说明 Ca 和 Ca+Mg 等处理均呈抑制 NAD-MDH 活性趋势，Mg 处理则呈前抑后促的趋势。

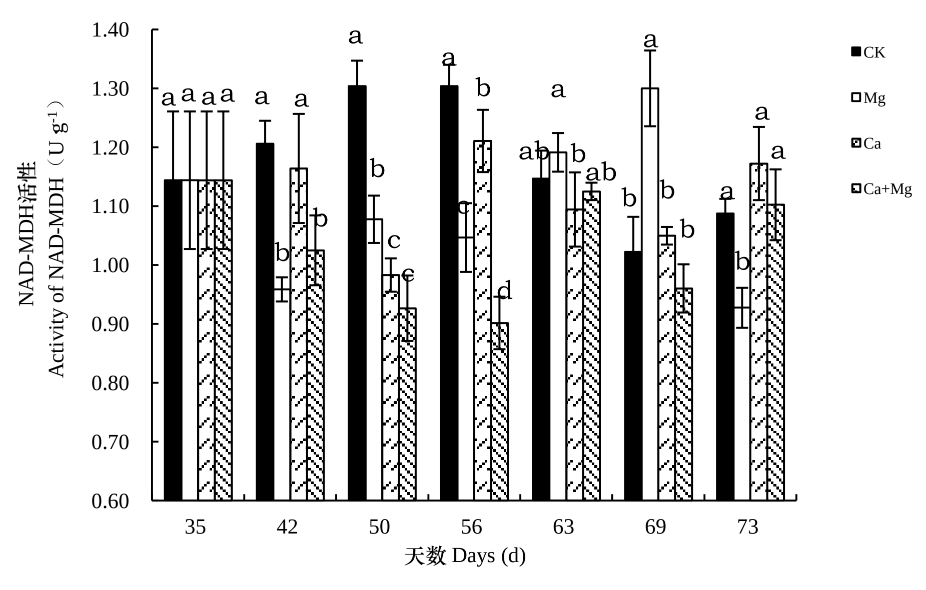


图 3 不同处理下的 NAD-MDH 活性动态变化

Fig. 3 Dynamic changes of NAD-MDH activities under different treatments

2.2.3 NADP-苹果酸酶（NADP-ME）

如图 4 所示，不同处理和 CK 的果肉 NADP-ME 活性具有不同的动态变化趋势。CK 呈“平缓、上升、下降、平缓、上升、平缓”的趋势；Mg 处理呈“平缓、下降、上升、下降”趋势；Ca 处理先无显著变化，随后呈“下降、平缓、下降”的趋势；Ca+Mg 处理在 35 d 至 50 d 无明显变化，随后显著下降再上升。由图 4 还可知，在花后 42 d，Ca 处理显著高于 CK 和其余处理；在花后 50 d，CK 显著最高，Mg 处理又显著高于 Ca 处理；在花后 63 d，Mg 处理显著高于 CK 和其余处理，而 CK 和 Ca 处理又显著高于 Ca+Mg 处理；在花后 69 d 和 73 d，CK 酶活均为最高，均显著高于 Ca 处理，其中在 69 d 时，Mg 和 Ca 处理显著高于 Ca+Mg 处理，在 73 d 时 Mg 处理又显著高于 Ca 处理。由此可见，Ca、Mg 和 Ca+Mg 处理均呈低于 CK 的趋势而呈抑制 NADP-ME 活性趋势。

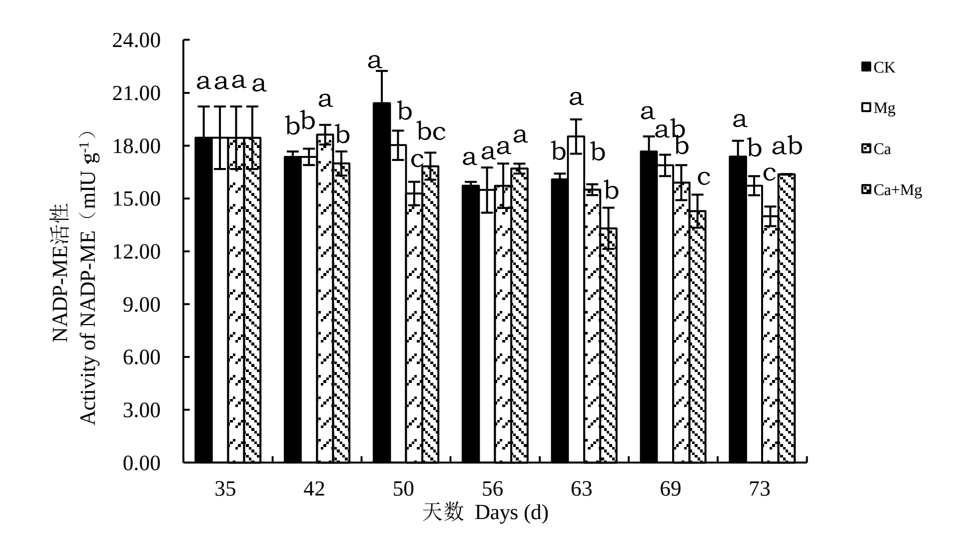


图 4 不同处理下的 NADP-ME 活性动态变化

Fig. 4 Dynamic changes of NADP-ME activities under different treatments

2.2.4 苹果酸合成酶（MS）

如图 5 所示，不同处理和 CK 的果肉 MS 活性具有不同的动态变化趋势。在花后 35 d 至 56 d，CK 和 Ca+Mg 处理均呈现“下降、上升、下降”趋势，而后 CK 维持稳定趋势，Ca+Mg 处理则持续降低至 63 d 后又上升；Ca 处理初始并无显著变化，随后历经两次“下降、上升”交替过程后趋于稳定；Mg 处理表现为“上升下降-上升下降”的趋势。由图 5 还可知，在花后 42 d，酶活由高往低顺序依次为 Mg、Ca、CK、Ca+Mg 处理，且任意两者间均具有显著差异性；在花后 50 d 至 63 d，CK 均为显著最高；在 56 d 和 63 d，Ca 和 Mg 处理又均显著高于 Ca+Mg 处理，其中在 63 d 时 Mg 处理还高于 Ca 处理；在花后 69 d，Mg 处理显著高于 CK 和其余处理，CK 和 Ca 处理又显著高于 Ca+Mg 处理；在花后 73 d，CK 显著高于 Mg 和 Ca+Mg 处理。由此可见，Ca 和 Ca+Mg 处理呈低于 CK 趋势，即呈抑制 MS 酶活性的趋势；Mg 处理在 42 d 和 69 d 时表现提高酶活性的作用。

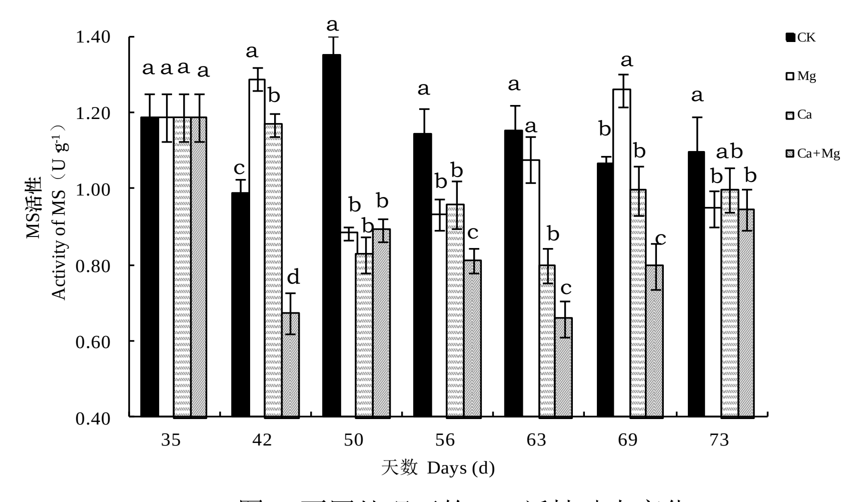


图 5 不同处理下的 MS 活性动态变化

Fig. 5 Dynamic changes of MS activities under different treatments

2.3 水溶性钙、镁含量变化

2.3.1 水溶性钙含量

如图 6 所示，四个处理在花后 63 d 前的水溶性钙含量均呈现上升趋势，63 d 后 CK 和 Ca 处理持续上升，Mg 处理上升至 69 d 再下降，Ca+Mg 处理则维持稳定。由图 6 还可知，在花后 42 d，按 Ca、Mg、CK、排序依次降低，且任意两者间均显著；在花后 50 d，Mg 处理显著最高，Ca 处理又显著高于 Ca+Mg 处理；在花后 56 d，Mg 处理仍为显著最高，CK 又显著高于 Ca 和 Ca+Mg 处理；在花后 63 d、69 d、73 d，Ca、Mg、Ca+Mg 处理分别呈显著最低、最高、最低。可见，Mg 处理高于 CK 和其余处理，而 Ca+Mg 处理则全程低于 CK 和 Mg 处理，说明 Mg 处理具有提高果肉水溶性钙含量的效果，而 Ca+Mg 处理呈降低水溶性钙含量的趋势，Ca 处理在 73 d 之后呈超越 CK 和其余处理的趋势。

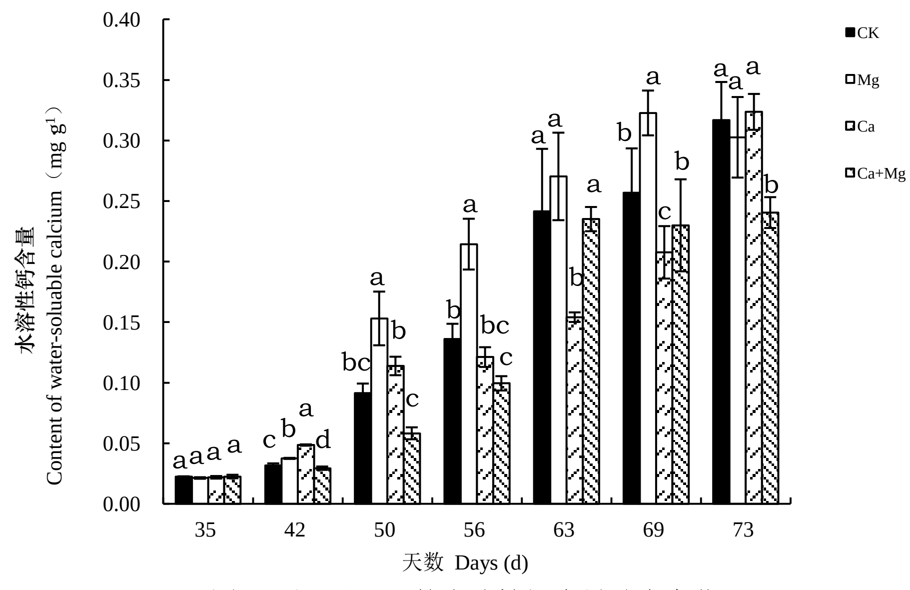


图 6 不同处理下的水溶性钙含量动态变化

Fig. 6 Contents changes of water-soluble calcium in different treatments

2.3.2 水溶性镁含量

如图 7 所示，从花后 35 d 开始至 56 d，不同处理和 CK 的水溶性镁含量均先上升再下降；在 56 d 至 69 d，CK 维持稳定，Ca+Mg 处理先无明显变化后显著下降，Ca 处理先下降再上升，Mg 处理则呈“下降、上升、下降”趋势。由图 7 还可知，在花后 42 d，CK 显著高于其余处理，Ca+Mg 处理又显著低于 Mg 和 Ca 处理；在花后 50 d，Mg 处理显著最高，在花后 56 dCa 处理均显著高于 CK 和 Ca+Mg 处理；在花后 63 d，CK 和 Ca+Mg 处理显著高于 Mg 和 Ca 处理；在花后 73 d，Ca+Mg 处理显著低于 CK 和 Ca 处理，Ca 处理又显著高于 CK。可见，Mg 和 Ca 处理能提高果肉水溶性镁含量，Ca+Mg 处理则呈降低水溶性镁含量的趋势。

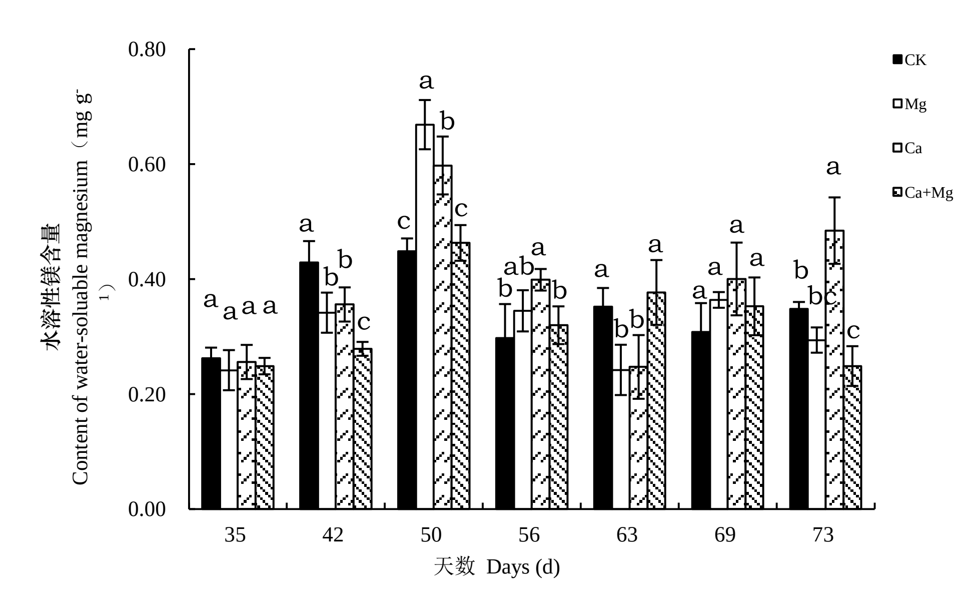


图 7 不同处理下的水溶性镁含量动态变化

Fig.7 Contents changes of water-soluble magnesium in different treatments

2.4 多元线性相关

2.4.1 苹果酸含量与相关酶活性的多元线性相关

对 CK 和不同处理的苹果酸含量与 PEPC、NAD-MDH、NADP-ME、MS 四种酶活性作多元线性相关性分析，结果如表 1 和表 2 所示。

由表 1 可知，CK 和 Ca 处理的 NADP-ME 及 Ca+Mg 处理的 PEPC、NAD-MDH 等活性分别与苹果酸含量呈正相关；CK 的 PEPC、MS 等活性与苹果酸含量则呈负相关。表明不同处理会改变酶活性与苹果酸含量的线性相关性，不同施肥处理能调节苹果酸的积累，并具有较为复杂的调节机制。

由表 2 可知，除 CK 的苹果酸外，三个处理的苹果酸含量与其四种酶活性的复相关系数分别显著或极显著，这也说明苹果酸积累是这些酶共同作用的结果，任意一种酶活性改变均会引起苹果酸含量的改变，不同处理可能通过影响这些酶活性而影响苹果酸含量。

表 1 不同处理的苹果酸含量与相关酶活性的显著偏相关系数

Table 1 Significant partial correlation coefficients between contents of malic acid and related enzymes activities in different treatments

处理和对照 Treatment and CK	苹果酸与 PEPC Malic acid and PEPC	苹果酸与 NAD-MDH Malic acid and NAD-MDH	苹果酸与 NADP-ME Malic acid and NADP-ME	苹果酸与 MS Malic acid and MS
CK	-0.503 13*	—	0.401 08*	-0.445 18*
Mg	—	—	—	—
Ca	—	—	0.489 40*	—
Ca+Mg	0.631 03**	0.637 50**	—	—

注：*表示显著性（P＜0.05）；**表示极显著性（P＜0.01）。下同。

Note：* represents significant (P＜0.05）; ** represents extremely significant (P＜0.01). The same below.

表 2 不同处理的苹果酸、水溶性钙、水溶性镁等含量分别与相关酶活性的复相关系数

Table 2 Multiple correlation coefficients between contents of malic acid, water-soluble calcium and water-soluble magnesium with related enzymes activities in different treatments

处理和对照 Treatment and CK	苹果酸与四种酶 Malic acid and four enzymes	水溶性钙与四种酶 Water soluble calcium and four enzymes	水溶性镁与四种酶 Water soluble magnesium and four enzymes
CK	0.546 07	0.646 91*	0.456 07
Mg	0.638 04*	0.547 53	0.550 09
Ca	0.859 18**	0.743 70**	0.552 72
Ca+Mg	0.812 34*	0.725 53*	0.518 16

2.4.2 水溶性钙、镁含量与相关酶活性的多元线性相关

对所有处理的水溶性钙、镁含量分别与 PEPC、NAD-MDH、NADP-ME、MS 四种酶活性作多元线性相关性分析，结果如表 2 和表 3 所示。

由表 3 可知，不同处理与 CK 水溶性钙、镁含量与相关酶活性的显著偏相关系数均为负相关，其中，CK 的水溶性钙抑制 NAD-MDH 的酶活性，仅 Mg 处理的水溶性钙对 NADP-ME 的酶活无抑制作用；Ca+Mg、Mg 处理的水溶性镁分别抑制 NAD-MDH、MS 活性。说明不同处理改变了水溶性钙、镁含量与四种酶活性的线性相关性，且不同的施肥处理通过调节苹果酸代谢相关酶活性而调节苹果酸的积累。

由表 2 可知，三个处理和 CK 的水溶性镁含量与其四种相关酶活性的复相关系数均无显著性，而 CK、Ca 和 Ca+Mg 处理的水溶性钙含量与四种酶的复相关系数则达显著或极显著水平，这说明叶面喷钙、镁能改变果肉水溶性钙含量，并使果肉水溶性钙含量与苹果酸代谢途径相关酶的活性产生线性相关性，进而调节果肉苹果酸的积累。

表 3 不同处理水溶性钙、镁含量与相关酶的显著偏相关系数

Table 3 Significant partial correlation coefficients between contents of water-soluble calcium and water-soluble magnesium with related enzymes in different treatments

处理和对照 Treatment and CK	水溶性钙与 NAD-MDH Water-soluble calcium and NAD-MDH	水溶性钙与 NADP-ME Water-soluble calcium and NADP-ME	水溶性镁与 NAD-MDH Water-soluble magnesium and NAD-MDH	水溶性镁与 MS Water-soluble magnesium and MS
CK	-0.608 03**	-0.468 56*	—	—
Mg	—	—	—	-0.471 78*
Ca	—	-0.638 08**	—	—
Ca+Mg	—	-0.658 02**	-0.429 5*	—

3 讨论与结论

钙存在多种形态，除了水溶性钙之外，还存在果胶酸钙、草酸钙、磷酸钙等（刘剑锋等，2004）。有研究表明，在苹果果实发育过程中，果实总钙和水溶性钙含量逐渐降低，果胶钙则先降后升，草酸钙含量逐渐升高，磷酸钙变化不明显（裴健翔，2019），此外，采前钙处理可以增加果实中的总钙和水溶性钙含量（魏树伟和王少敏，2018）。本研究结果显示，经过烘干后四个处理的水溶性钙含量总体呈上升趋势，除受基因遗传影响外，也可能由于烘干后各种形式的钙转化为水溶性钙，因此总体表现为上升趋势。不同处理在花后 63 d 后的趋势表现出差异，63 d 后 CK 和 Ca 处理持续上升，Mg 和 Ca+Mg 处理则与之不同，这可能为

Ca^{2+}和 Mg^{2+}等离子间的复杂作用引起。本研究结果表明，单独喷施钙或镁营养分别促进果肉中水溶性钙、镁积累增多，Ca+Mg 处理则会抑制水溶性钙、镁的积累。丁玉川等（2012）在甘蓝上报道钙、镁的吸收可能存在协同关系，本课题组前期研究中水溶性钙和镁存在相互增益效应（高丹等，2017），在猕猴桃叶片上 Ca 和 Mg 存在相互抑制吸收作用（刘科鹏，2013）。可见水溶性钙、镁积累除了受遗传差异影响外，也可能存在同时喷施钙、镁营养可能还会抑制植物体吸收钙、镁矿质元素。

在果实发育过程中，通常果实成熟时，酸度会降低（张秀梅等，2007）。Wang et al.（2006）研究也表明荔枝的苹果酸成熟前呈下降趋势。本研究显示，‘妃子笑’荔枝果肉苹果酸含量的变化趋势与前人研究相似，表现为急剧下降后逐渐趋于稳定。本研究结果表明，Ca、Mg 和 Ca+Mg 处理前期呈促进影苹果酸积累的趋势，在果实生长发育后期仅 Ca 处理呈促进苹果酸积累的趋势，由于有机酸是呼吸代谢中间产物，其积累可能负反馈调节果肉呼吸作用（Zabalza et al., 2009；杨春宁等，2016），这可能导致 Ca 处理果肉呼吸代谢在后期较弱，从而积累糖分较多，即出现本课题组前期研究结果：Ca 缓解果肉“退糖”现象（苏阳等，2015b）。对于本课题组前期研究结果 Ca+Mg 处理也具有缓解“退糖”现象，可能是 Ca+Mg 处理在果实生长发育后期促进其他有机酸的积累的缘故；Mg 处理可能因为其与 CK 一样在果实生长发育后期未引起苹果酸和其他有机酸的积累改变。施肥改变了植物细胞体内细胞壁上的电荷变化与 Mg^{2+}等阳离子的竞争作用（李跃鹏等，2011），改变了介质中的 H^{+}和 OH^{-}的比例，从而改变了植物体内的 pH 值（郭悦等，2019），进而影响了有机酸含量。可见，叶面喷施钙镁肥会影响果肉中水溶性钙、镁的含量，Ca 处理通过促进苹果酸的积累而促进总酸积累。

苹果酸合成与丙酮酸羧化酶、苹果酸脱氢酶、苹果酸裂合酶、苹果酸酶有关（吴军林等，2014；王西成等，2017）。苹果酸合成酶（MS）是乙醛酸循环的关键酶（王程等，2011），乙醛酸循环为三羧酸循环的回补途径，与苹果酸的积累有重要作用。在枇杷果实的研究中，苹果酸的差异主要是 NAD-MDH 和 NADP-ME 的差异造成的，与 PEPC 也有关系（秦巧平等，2012）。马倩倩等（2017）研究表明，酸枣发育过程中苹果酸与 NAD-MDH 活性正相关，与 NADP-ME 活性负相关。李航等（2019）在樱桃果实上的研究也表明 PEPC、NAD-MDH 与苹果酸呈显著正相关，NADP-ME 与苹果酸呈负相关。本研究显示，苹果酸含量与 PEPC 活性的相关关系因施肥处理不同而出现差异；CK 和 Ca 处理的苹果酸含量与 NADP-ME 活性、Ca+Mg 处理的苹果酸含量和 NAD-MDH 活性等呈正相关，CK 的苹果酸含量与 MS 活性呈负相关。可见，本研究结果与前人研究结果并非完全一致，这可能与果实种类不同有关，说明不同施肥处理影响有机酸代谢具有不同的生化机理，作用于不同的靶标关键酶，进而引起苹果酸积累发生改变。本研究还发现叶面喷施钙、镁营养会影响苹果酸代谢相关酶活性，并且会改变苹果酸含量与苹果酸代谢相关酶活性的复相关关系。Ca^{2+}和 Mg^{2+}能构成细胞渗透压，或起到活化酶，或成为酶和底物之间的桥接元素（Mengel et al., 2001），所以钙镁营养确实会影响酶活性及各种酶之间的联系，且 Mg 和 Ca 处理在后期或有提高酶活的作用。离子间也会存在协助作用（李联葆和王利平，2007），由于 Ca^{2+}具有稳定质膜结构的特殊功能，有助于质膜的选择性吸收，所以 Ca^{2+}对多种离子的吸收有协助作用（Inbal et al., 2000）。叶面钙镁营养改变了果肉水溶性钙、镁的积累，进而可能改变酶与其底物的结合特点，这可能是本研究钙镁营养影响酶活性及各种酶活性相关性的原因。

综上所述，‘妃子笑’荔枝果实的苹果酸含量在果实发育过程中呈急剧减少后保持稳定的“L”型趋势，苹果酸积累差异受 PEPC、NAD-MDH、NADP-ME 和 MS 等四种关键酶共同调控，叶面喷施钙、镁通过影响四种关键酶活性及其与苹果酸含量的相关性而调节果肉苹果酸的积累，进而影响果肉的总酸含量和风味营养品质。叶面喷施钙肥通过促进苹果酸积累而抑制果肉呼吸作用，进而缓解妃子笑荔枝果肉成熟期“退糖”现象。关于叶面喷施钙、镁

营养调节四种关键酶活性和苹果酸含量的详细生物学机制还有待深入研究。

参考文献：

BERÜTER J, 2004. Carbohydrate metabolism in two apple genotypes that differ in malate accumulation[J]. J Plant Physiol, 161(9): 1011–1029.

CHEN FX, LIU XH, CHEN LS, 2005. Advances in research on organic acid metabolism in fruits [J]. J Fruit Sci, 22(5): 526–531. [陈发兴，刘星辉，陈立松，2005. 果实有机酸代谢研究进展[J]. 果树学报，22(5)：526–531.]

CHEN YG, GUO JC, HE F, et al., 2008. Development status and countermeasures of Hainan litchi [J]. Chin Trop Agric, 1(3): 21–23. [陈业光，过建春，何凡，等，2008. 海南荔枝发展现状及对策[J]. 中国热带农业，1(3)：21–23.]

CRECELIUS F, STREB P, FEIERABEND J, 2003. Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold-hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves[J]. J Exp Bot, 54(384): 1075–1083.

DING YC, JIAO XY, NIE D, et al., 2012. Effects of combined application of different nitrogen sources and magnesium on cabbage yield, quality and nutrient uptake [J]. Chin J Eco-Agric, 20(8): 996–1002. [丁玉川，焦晓燕，聂督，等，2012. 不同氮源与镁配施对甘蓝产量、品质和养分吸收的影响[J]. 中国生态农业学报，20(8)：996–1002.]

GAO D, LI SJ, WANG Z, et al., 2017. The primary mechanisms on the effects of Ca and Mg applied in foliar nutrients on the pericarp colouring of *Litchi chinensis* Sonn. cv Sanyuehong [J]. Chin Soils Fert, 1(3)：80–88.[高丹，李世军，王展，等，2017. 叶面喷施 Ca 和 Mg 肥影响三月红荔枝果皮着色的初步机理[J]. 中国土壤与肥料，1(3)：80–88.]

GUO RZ, GUO WL, LI XY, et al., 2013. Changes of organic acid contents and relative enzyme activities during the development of Huangguan pear fruit [J]. Jiangsu J Agric Sci, 29(1): 157–161. [郭润姿，郭文岚，李兴元，等，2013. 黄冠梨果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化[J]. 江苏农业学报，29(1)：157–161.]

GUO Y, YANG J, GUO JM, et al., 2019. Mechanism of nitrogen, phosphrous and potassium combined application promote absorption, transportation and accumulation of Pb in sunflower (*Helianthns annuus* L.) [J]. Plant Nutr Fert Sci, 25(11): 1998 2008. [郭悦，杨军，郭俊娒，等，2019. 氮磷钾配施促进向日葵铅吸收转运的机制[J]. 植物营养与肥料学报，25(11)：1998–2008.]

HIRAI M, UENO I, 1977. Development of citrus fruits: Fruit development and enzymatic changes in juice vesicle tissue1[J]. Plant Cell Physiol, 18(4): 791–799.

HU ZQ, WANG HC, HU GB, 2005. Measurement of sugar, organic acids and vitamin C in litchi friut by high performance liquid chromatography [J]. J Fruit Sci, 22(5): 582–585. [胡志群，王惠聪，胡桂兵，2005. 高效液相色谱测定荔枝果肉中的糖、酸和维生素 C[J]. 果树学报，22(5)：582–585.]

INBAL N, SHOSEYOV O, WEISS D, 2010. Sugars enhance the expression of gibberellins-induced genes in developing petunia flowers [J]. Physiol Plant, 109(2): 196-202.

LI H, TAO HQ, CHEN YX, et al., 2019. Evaluation of organic acid accumulation and metabolism related enzymes activities in two Chinese cherry fruits [J]. NW Chin J Agric Sci, 28(12): 2019 2026. [李航，陶海青，陈益香，等，2019. 2 种中国樱桃果实有机酸积累及代谢相关酶活性的研究[J]. 西北农业学报，28(12)：2019–2026.]

LI LB, WANG LP, 2007. Effects of external environment on crop nutrient uptake and fertilization

characteristics of fruit trees [J]. J Inner Mongol Agric Sci Technol, (S1):290-292. [李联葆，王利平，2007. 外界环境对作物吸收养分的影响及果树施肥特点[J]. 内蒙古农业科技，(S1)：290-292.]

LIN JY, TIAN QL, HUANG WH, et al., 2021. Effects of selenium application on plant growth physiology and fruit quality of three banana varieties [J]. Guihaia. https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20210602.0905.002.html. [刘洁云，田青兰，黄伟华，等，2021. 施硒对3个香蕉品种植株生长、生理及果实品质的影响[J]. 广西植物. https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.Q.20210602.0905.002.html.]

LIU JF, TANG P, PENG SA, 2004. Effects of calcium dipping after harvest on content of calcium in different forms and physio-chemical characteristcs of pear [J]. J Huazhong Agric Univ, 23(05): 560-562. [刘剑锋，唐鹏，彭抒昂，2004. 采后浸钙对梨果实不同形态钙含量及生理生化变化的影响[J]. 华中农业大学学报，23(5)：560-562.]

LIU KP, 2013. Fruit quality of kiwifruit and its correlation with soil and leaf nutrition [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University. [刘科鹏，2013. 猕猴桃果实品质与土壤、叶片营养的关系[D]. 南昌：江西农业大学.]

LI YP, YIN H, YE JS, et al., 2011. Cation exchange during the process of Cd^{2+} absorption by alfalfa in aqueous solutions [J]. Chin J Environ Sci, 32(11): 3341–3347. [李跃鹏，尹华，叶锦韶，等，2011. 紫花苜蓿吸收水溶液中 Cd^{2+}过程的阳离子交换[J]. 环境科学，32(11)：3341–3347.]

LUO AC, YANG XH, DENG YY, et al., 2003. Organic acid concentrations and the relative enzymatic changes during the development of citrus fruits [J]. Sci Agric Sin, 36(8): 941–944.. [罗安才，杨晓红，邓英毅，等，2003. 柑橘果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化[J]. 中国农业科学，36(8)：941–944.]

MA QQ, PU XQ, WANG D, et al., 2017. Changes of organic acid concentration and acid-matabolising enzymatic activities during the development of jujube fruits [J]. NW Chin J Agric Sci, 26(12): 1821–1827. [马倩倩，蒲小秋，王德，等，2017. 枣果实发育过程中有机酸质量分数及相关代谢酶活性的变化[J]. 西北农业学报，26(12)：1821–1827.]

MALDONADO R, SANCHEZ-BALLESTA M T, ALIQUE R, et al., 2004. Malate metabolism and adaptation to chilling temperature storage by pretreatment with high CO_2 levels in *Annona cherimola* fruit[J]. J Agric Food Chem, 52(15): 4758–4763.

MENGEL K, KIRKBY E A, KOSEGARTEN H, et al., 2001. Principles of plant nutrition[M]. Dordrecht：Springer.

PEI JX, 2019. Effects of exogenous calcium on calcium metabolism and fruit quality of ‘Hanfu’ apple [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [裴健翔，2019. 外源钙对‘寒富’苹果果实钙代谢及果实品质影响的研究[D]. 北京：中国农业科学院.]

QIAO F, HUANG QL, FANG CF, et al., 2012. Comparison of taste-related compounds and analysis using electronic tongue of Feizixiao and Huaizhi Lychee fruits from different planting area [J]. Chin J Food Biotechnol, 31(9): 984－990. [乔方，黄略略，方长发，等，2012. 不同产区的妃子笑及怀枝荔枝的甜酸滋味物质比较及电子舌分析[J]. 食品与生物技术学报，31(9)：984–990.]

QIN QP, LIN FF, ZHANG LL, 2012. Review of the studies on the accumulation mechanisms of sugar and organic acids in *Eriobotrya japonica* fruit [J]. J Zhejiang Agric For Univ, 29(3): 453–457. [秦巧平，林飞凡，张岚岚，2012. 枇杷果实糖酸积累的分子生理机制[J]. 浙江农林大学学报，29(3)：453–457.]

SU Y, ZHOU XC, GAO D, et al., 2015. Effects of the changes in the contents of K, Ca and Mg in pericarp on the pericarp's coloring of *Litchi chinensis* cv. Ziniangxi [J]. Guihaia, 35(3): 354–359. [苏阳，周晓超，高丹，等，2015. 紫娘喜荔枝果皮 K、Ca 和 Mg 含量变化对着色的影响[J]. 广西植物，35(3):：354–359.]

SU Y, ZHOU XC, GAO D, et al., 2015. Studies on the relationship between the main flavor components and the contents of k, ca and mg in flesh of Feizixiao Litich（*Litchi chinensis* Sonn. cv Feizixiao） [J]. Chin J Trop Crops, 36(6): 1131–1135. [苏阳，周晓超，高丹，等，2015. ‘妃子笑’荔枝果肉中主要风味物质与钾钙镁含量的关系[J]. 热带作物学报，36(6)：1131–1135.]

SURENDRANATHAN KK, NAIR PM, 1976. Stimulation of the glyoxylate shunt in gamma-irradiated banana[J]. Phytochemistry, 15(3): 371–373.

WANG C, WANG A, ZHAO CJ, et al., 2011. Characterization and physiological role of malate synthase A in *Escherichia coli* [J]. Chin J Biol, 28(2): 39-42. [王程，王敖，赵昆军，等，2011. 大肠杆菌苹果酸合酶 A 的酶学和生理功能研究[J]. 生物学杂志，28(2)：39-42.]

WANG HC, HUANG H, HUANG X, et al., 2006. Sugar and acid compositions in the arils of *Litchi chinensis* Sonn.: Cultivar differences and evidence for the absence of succinic acid[J]. J Hortic Sci Biotechnol, 81: 57–62.

WANG RD, WANG YP, LI N, et al., 2016. Determination of organic acids in six kinds of vinegar by high performance liquid chromatography [J]. Chin Condiments, 41(9): 118–122. [王芮东，王艳萍，李楠，等，2016. 六种食醋中有机酸成分的 HPLC 测定分析[J]. 中国调味品，41(9)：118–122.]

WANG C, QIAO YM, WU WM, et al., 2017. Effects of 6-BA on organic acid content and related genes expression in grape berry [J]. Acta Agric Boreal-Sin, 32(5): 149–153. [王西成，钱亚明，吴伟民，等，2017. 6-BA 对葡萄果实中有机酸积累及相关基因表达的影响[J]. 华北农学报，32(5)：149–153.]

WANG XH, CHEN H, DONG XQ, 2018. Changes in organic acids content during ‘Fengtang’ plum (*Prunus salici-na*) fruit development in relation to malic acid metabolism related enzymes [J]. J Fruit Sci, 35(3): 293–300. [王小红，陈红，董晓庆，2018. ‘蜂糖李’果实发育过程中有机酸含量变化及其与苹果酸代谢相关酶的关系[J]. 果树学报，35(3)：293–300.]

WEI SW, WANG SM, 2018. Effects of calcium treatment on aroma of Nanguo Pear[C]//Qingdao: Abstracts of the 2018 Annual Conference of Chinese Society of Horticulture. [魏树伟，王少敏，2018. 钙处理对“南果梨”果实香气的影响[C]// . 青岛：中国园艺学会 2018 年学术年会论文摘要集.]

WEN QY, 2012. Study on organic acid and sugar metabolism of litchi fruit during ripening and storage [D]. Guangzhou: South China Agricultural University.[温青玉，2012. 荔枝果实成熟及贮藏期间有机酸和糖代谢研究[D]. 广州：华南农业大学.]

WU JL, WU QP, ZHANG JM, et al., 2014. Progress in *L*-malic acid biosynthesis [J]. Food Sci, 35(3): 238–242. [吴军林，吴清平，张菊梅，等，2014. L-苹果酸生物合成研究进展[J]. 食品科学，35(3)：238–242.]

YANG CN, SUN ZR, QU JX, et al., 2016. Effects of organic acids on respiration metabolism and glycyrrhizic acid accumulation of Glycyrrhizin [J]. Infor Tradit Chin Med, 33(5): 1–3. [杨春宁，孙志蓉，曲继旭，等，2016. 有机酸对甘草呼吸代谢及甘草酸积累的影响[J]. 中医药信息，33(5)：1–3.]

YIN L, ZHANG F, TANG YT, et al., 2013. Methods Comparison of the determination of K^+, Na^+,

Ca^{2+}, Mg^{2+} in atmospheric precipitation [J]. Environ Mon Mgmt Technol, 25(5): 60–62. [殷丽，张飞，唐溢湉，等，2013. 大气降水中钾钠钙镁测定方法的比对[J]. 环境监测管理与技术，25(5)：60–62.]

ZABALZA A, DONGEN JT VAN, FROEHLICH A, et al., 2009. Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration[J]. Plant Physiol, 149(2): 1087–1098.

ZHANG H, 2009. Study on the formation mechanism of orgainc acid, sugar acid inheritance and accumulation simulation in flavor melon [D]. Yangling: Northwest Agriculture & Forestry University. [张红，2009. 风味甜瓜果实酸味形成机理及糖酸遗传和积累模拟研究[D]. 杨凌：西北农林科技大学.]

ZHANG QY, GU KD, WANG JH, et al., 2020. BTB-BACK-TAZ domain protein MdBT2-mediated MdMYB73 ubiquitination negatively regulates malate accumulation and vacuolar acidification in apple[J]. Hortic Res, 7(1): 1–12.

ZHNANG XM, DU LQ, SUN GM, et al., 2007. Changes in organic acid concentrations and the relative enzyme activities during the development of Cayenne pineapple fruit [J]. J Fruit Sci, 24(3): 381–384. [张秀梅，杜丽清，孙光明，等，2007. 菠萝果实发育过程中有机酸含量及相关代谢酶活性的变化[J]. 果树学报，24(3)：381–384.]

ZHOU XY, ZHU CH, LI JX, et al., 2015. Research progress in organic acid metabolism of fruit [J]. S Chin Fruits, 44(1): 120-125. [周先艳，朱春华，李进学，等，2015. 果实有机酸代谢研究进展[J]. 中国南方果树，44(1)：120-125.]

ZHU HQ, 2013. Genetic analysis and QTL mapping of citric acid content, titratable acidity and pH in melon (*Cucumis melo* L.) fruits [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. [朱慧芹，2013. 甜瓜果实柠檬酸含量、可滴定酸和 pH 的遗传分析与 QTL 定位[D]. 北京：中国农业科学院.]